

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

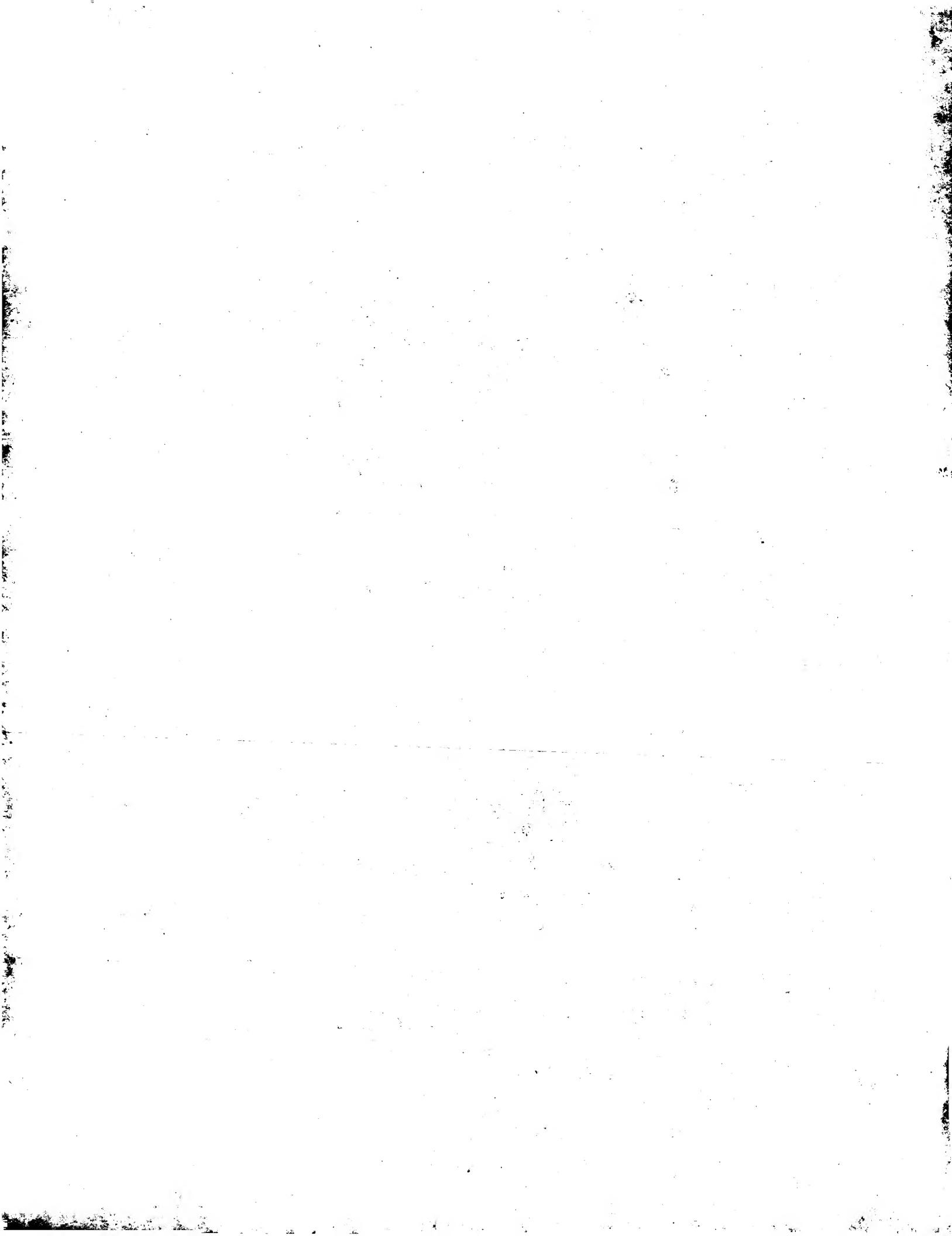
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



Doc. 1-1 on ss 5 from WPIL using MAX

©Derwent Information

High purity chitin prodn - by digestion of powdered dried crustacean shells with hydrochloric acid and treating the residue with sodium hydroxide soln**Patent Number : FR2701266***International patents classification : C07B-000/00 C08B-037/08***• Abstract :**

FR2701266 A Chitin (I) of high purity is obtnd. by (A) drying crustacean shells and milling the dried shells into a fine powder; (B) initially digesting the powder in 0.4-3 M HCl soln. at -10 to +10deg.C for 10-25 h and then subjecting it to a supplementary digestion in the HCl soln. at 10-20deg.C for 2-8 h; (C) washing the HCl-treated material with water, filtering, rinsing with an organic solvent and drying to yield crude chitin; (D) steeping and heating the crude chitin in 2-10 wt.% NaOH soln.; and (E) washing with water, filtering, rinsing with organic solvent and drying the NaOH-treated chitin to yield chitin of high purity.

USE - The chitin (I) is suitable for use in biomedical applications and for conversion by deacetylation into chitosan (II) which is also of biomedical grade.

ADVANTAGE - The process gives biomedical grade chitin and chitosan with a high degree of purity, high mol.wt. and good degree of whiteness.
(Dwg.0/0)

• Publication data :

Patent Family : FR2701266 A1 19940812 DW1994-34 C08B-037/08 18p * AP: 1993FR-0010401 19930831
NO9302662 A 19940809 DW1994-35 C08B-037/08 AP:
1993NO-0002662 19930723
CA2101079 A 19940809 DW1994-38 C08B-037/08 AP:
1993CA-2101079 19930721
JP06239902 A 19940830 DW1994-39 C08B-037/08 7p AP:
1993JP-0271680 19931029
JP95030123 B2 19950405 DW1995-18 C08B-037/08 7p FD:
Based on JP6239902 AP: 1993JP-0271680 19931029
IT1270966 B 19970526 DW1998-03 C07B-000/00 AP: 1993IT-
MI01842 19930824
KR9708132 B1 19970521 DW1999-42 C08B-037/08 AP:
1993KR-0001687 19930208
KR-190723 B1 19990601 DW2000-56 C08B-037/08 AP:
1993KR-0001687 19930208; 1997KR-0008516 19970313
Priority n° : 1993KR-0001687 19930208; 1997KR-0008516
19970313
Covered countries : 6
Publications count : 8

• Patentee & Inventor(s) :

Patent assignee : (JEON) JEON D
(INRM) INSERM INST NAT SANTE & RECH MEDICALE
(CHON) CHON D
Inventor(s) : JEON D; CHON D

• Accession codes :

Accession N° : 1994-273352 [34]
Sec. Acc. n° CPI : C1994-124951

• Derwent codes :

Manual code : CPI: B04-C02E3 D05-
H17A6
Derwent Classes : B04 D17

• Update codes :

Basic update code : 1994-34
Equiv. update code : 1994-35; 1994-38;
1994-39; 1995-18; 1998-03; 1999-42; 2000-
56

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 701 266

(21) N° d'enregistrement national : 93 10401

(51) Int Cl^o : C 08 B 37/08

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 31.08.93.

(71) Demandeur(s) : JEON Dong-Won — KR.

(30) Priorité : 08.02.93 KR 9301687.

(72) Inventeur(s) : JEON Dong-Won.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 12.08.94 Bulletin 94/32.

(73) Titulaire(s) :

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule.

(74) Mandataire : Cabinet Weinstein.

(54) Procédé de préparation de chitine et de chitosane de grade biomédical.

(57) La présente invention se rapporte à un procédé de préparation d'une chitine de grade biomédical d'une pureté et d'une blancheur élevées avec un poids moléculaire élevé et d'un chitosane de grade biomédical d'un haut degré de déacétylation et d'un poids moléculaire élevé à partir de la chitine produite selon la présente invention.

Spécifiquement, le procédé de préparation de la chitine selon la présente invention comprend les étapes de:

(A) séchage de coquilles de crustacés et broyage des coquilles séchées pour fournir une poudre finement broyée;

(B) digestion initialement de la poudre dans une solution de HCl à une température comprise entre -10 et 10°C pendant une période comprise entre 10 et 25 heures et, après cela, digestion supplémentaire de la poudre dans la solution de HCl à une température comprise entre 10 et 20°C pendant une période comprise entre 2 et 8 heures;

(C) lavage avec de l'eau, filtration, rinçage avec un solvant organique et séchage du matériau traité avec HCl pour fournir une chitine brute;

(D) trempage et séchage de la chitine brute dans une solution de NaOH; et

(E) lavage avec de l'eau, filtration, rinçage avec le solvant organique et séchage de la chitine traitée avec NaOH pour obtenir la chitine de haute pureté.

Ce procédé trouve application dans la préparation de chitine de grade biomédical et de chitosane de grade bio-

FR 2 701 266 - A1

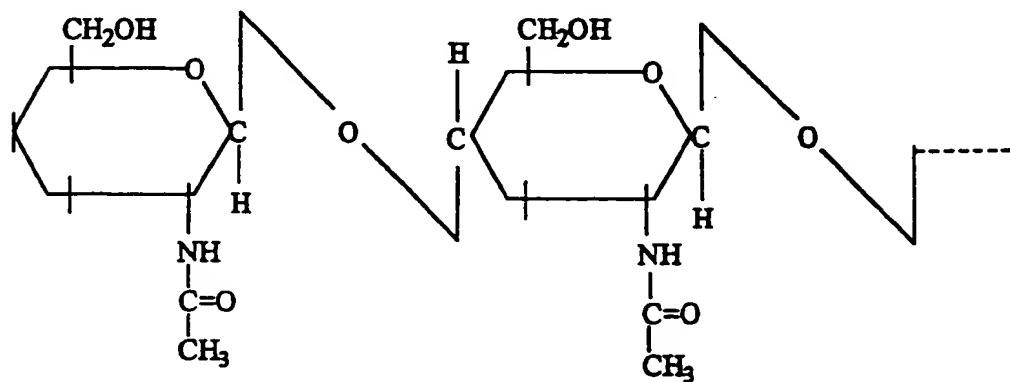


La présente invention se rapporte à un procédé pour la préparation de chitine et de chitosane, et, particulièrement, à un procédé pour préparer une chitine de grade biomédical avec une pureté et une blancheur élevées avec un poids moléculaire élevé et un chitosane de grade biomédical avec un poids moléculaire élevé avec un niveau pratiquement complet de déacétylation.

5 La chitine qui est le second polysaccharide le plus abondamment disponible est un biopolymère à valeur ajoutée élevée normalement extrait des coquilles des crustacés (par exemple, les crevettes et les crabes). Cependant, comme la chitine est insoluble dans l'eau, elle est conventionnellement convertie en chitosane—qui est composé de polyamines linéaires de poids moléculaire élevé, soluble dans l'eau, et industriellement plus utile que la chitine—par une réaction de déacétylation.

10 Avec l'abondance des déchets de coquilles de poisson disponibles, beaucoup d'études commerciales ont été faites sur des applications variées de la chitine extraite de telles coquilles. Au départ, les dérivés de chitine et de chitosane ont été employés principalement en tant que coagulant utile pour la récupération de matériaux valorisables, par exemple, de protéine provenant des déchets alimentaires. Récemment, leurs applications ont été étendues de plus à des domaines variés tels que l'industrie alimentaire, la médecine, la biochimie 15 impliquant l'utilisation d'une membrane, les porteurs immobilisant des microorganismes et les enzymes, les cosmétiques, l'agriculture, l'ingénierie chimique, la protection environnementale et les analogues.

20 La chitine est préparée conventionnellement à partir de coquilles par un procédé comprenant un prétraitement, une déprotéinisation et une déminéralisation de celles-ci ; et, le produit final est caractérisé par sa structure 25 de la formule suivante :

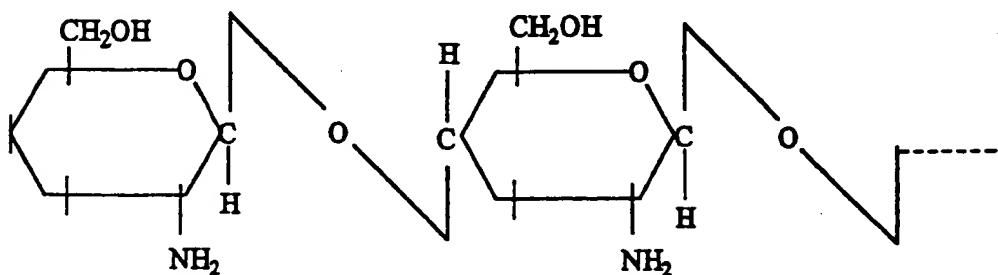


Un des procédés bien connu pour préparer la chitine est celui proposé par Whistler & BeMiller, qui comprend : le lavage et le séchage des coquilles de crabe dans une étuve à vide à 50°C ; le broyage et le trempage des coquilles séchées dans une solution à 10% de NaOH à température ambiante pendant 5 jours pour les déprotéiniser ; le lavage du matériau déprotéinisé avec de l'eau jusqu'à l'élimination des alcalis et ensuite avec un solvant organique et le séchage du matériau blanc résultant sous une pression réduite ; l'introduction du matériau séché dans une solution à 37% de HCl à -20°C pendant 4 heures pour produire une chitine brute ; le lavage de la chitine brute avec de l'eau froide et avec le solvant organique ; et la répétition dudit trempage dans une solution de HCl froide et desdites procédures de lavage pour produire une chitine en tant que produit final.

Alternativement, une chitine peut être préparée par le procédé Hackmann bien connu, qui comprend : le lavage et le séchage des coquilles dans une étuve à 100°C ; la digestion des coquilles séchées avec du HCl 2N à température ambiante pendant 5 heures ; le lavage, le séchage et le broyage des matériaux digérés ; l'extraction de matériaux finement broyés avec du HCl 2N à 0°C pendant 2 jours sous agitation occasionnelle ; le lavage des matériaux extraits avec de l'eau ; l'extraction des matériaux lavés avec NaOH 1N à 100°C pendant 12 heures sous agitation occasionnelle ; et la répétition du traitement avec NaOH quatre fois ou plus.

En contraste, le chitosane est préparé par déacétylation de la chitine par un traitement biologique ou chimique ; et, est caractérisé par la structure de la formule suivante :

25



Comme montré dans la formule ci-dessus, puisque le chitosane a trois groupes amino libres, il tend à être chimiquement réactif.

Spécifiquement, le chitosane peut être facilement obtenu par déacétylation de la chitine obtenue selon une méthode connue comme décrite ci-dessus avec une solution à 30-50 % de NaOH pendant 5-20 heures.

- Cependant, puisque les procédés de l'art antérieur pour préparer la chitine sont pratiqués sous des conditions de réaction relativement sévères dans le but de réduire la teneur en protéines ou CaCO₃ dans celle-ci, il y a de nombreux désavantages : qui sont que, dans le procédé de Whistler et BeMiller ci-dessus, puisque la déprotéinisation avec une solution de NaOH est suivie par la déminéralisation avec une solution concentrée de HCl, une rupture dans la chaîne de la chitine se produit, résultant par là en une chitine ayant un poids moléculaire inférieur ; la chitine ainsi obtenue peut se décolorer lorsqu'exposée à l'air, a une teneur relativement élevée en impuretés et, donc, peut ne pas être appropriée pour des applications telles que dans les domaines biomédicaux et dans les industries alimentaires ; et, de plus, même lorsque la minéralisation est conduite à des températures très basses l'utilisation d'une solution concentrée de HCl peut aussi provoquer des ruptures dans la chaîne. D'autre part, dans le procédé Hackmann, la température ambiante ou plus élevée utilisée durant le traitement avec HCl pour éliminer CaCO₃ peut provoquer des ruptures dans la chaîne principale de la chitine.
- Pour résoudre les problèmes ci-dessus mentionnés, donc, les présents inventeurs ont mené une recherche intensive pour découvrir un nouveau procédé capable de produire des grades biomédicaux de chitine et de chitosane au moyen du contrôle soigneux des conditions de réaction, spécialement de la température employée pendant l'étape de déminéralisation et l'utilisation d'un gaz inerte pendant l'étape de déprotéinisation.

C'est donc un objet de la présente invention de fournir un procédé pour la préparation de chitine de grade biomédical ayant une pureté élevée, un poids moléculaire élevé et une blancheur améliorée.

- Un autre objet de la présente invention est de fournir un procédé pour préparer un chitosane de grade biomédical avec un poids moléculaire élevé et une déacétylation pratiquement complète, à partir de la chitine de grade biomédical préparée selon la présente invention.

En tant qu'un aspect de l'invention, il est fourni un procédé pour préparer une chitine de grade biomédical, qui comprend les étapes de :

- (A) séchage et broyage des coquilles de crustacés pour fournir une poudre de coquilles finement broyée ;

(B) digestion initialement de la poudre dans une solution de HCl à une température dans l'intervalle de -10 à 10°C pendant une période de 10 à 25 heures, et, après cela, la digestion supplémentaire de la poudre dans la solution de HCl à une température de 10 à 20°C pendant une période de 2 à 8 heures ;

5 (C) lavage avec de l'eau, filtration et rinçage avec un solvant dudit matériau traité avec HCl pour fournir une chitine brute ;

(D) trempage et chauffage de la chitine brute dans une solution de NaOH ;

10 (E) lavage avec de l'eau, filtration et rinçage avec un solvant de ladite chitine traitée avec NaOH pour produire la chitine de grade biomédical.

Selon une caractéristique du procédé de préparation de la chitine de grade biomédical selon l'invention, ladite digestion initiale de l'étape (B) est menée à une température de -5 à 5°C pendant une période de 15 à 20 heures et la digestion supplémentaire de cette étape est mise en oeuvre à une température de 12 à 18°C pendant une période de 3 à 5 heures.

15 Une autre caractéristique du procédé de production de chitine selon l'invention est que le séchage des coquilles de l'étape (A) est conduit dans le noir jusqu'à ce que la teneur en eau des coquilles soit de 12 % ou moins.

20 Selon encore une autre caractéristique du procédé de préparation de chitine selon l'invention, la digestion de l'étape (B) est conduite avec une agitation au moyen d'un agitateur mécanique à une vitesse comprise entre 50 et 200 tours par minute.

25 Une caractéristique supplémentaire du procédé de production de chitine de l'invention, est que la digestion de l'étape (B) est mise en oeuvre en une étape à une température comprise entre -10 et 8°C pendant une période de 20 à 60 heures.

Dans ce cas on précisera que ladite digestion en une étape est mise en oeuvre à une température comprise entre -5 et 5°C pendant une période de 30 à 50 heures.

30 Toujours une autre caractéristique du procédé de production de chitine de l'invention est que le solvant employé dans les étapes (C) et (E) est choisi dans le groupe consistant de l'éthanol, méthanol, acétone, tétrahydrofurane, dioxane et méthyl éthyl cétone.

35 On ajoutera que dans le procédé de production de chitine de l'invention le trempage avec la solution de NaOH de l'étape (D) est mené en présence d'un gaz inerte.

On précisera également que les étapes (D) et (E) du procédé de production de chitine selon l'invention sont répétées deux fois ou plus.

Dans le cas où ces opérations sont répétées deux fois ou plus, la chitine de pureté élevée produite est trempée dans de l'eau déionisée pendant 3 à 4 jours, puis filtrée et séchée.

Un autre aspect de l'invention réside dans un procédé pour préparer un chitosane de grade biomédical, qui comprend les étapes de :

(a) trempage de la chitine préparée selon la méthode de la présente invention dans une solution de NaOH à une température comprise entre 80 et

10 100°C pendant une période comprise entre 2 et 12 heures pour fournir un chitosane brut ;

(b) filtration, lavage avec de l'eau, trempage dans de l'eau déionisée et ensuite dans un mélange aqueux d'un solvant organique miscible à l'eau, filtration et séchage du chitosane brut ; et

15 (c) la répétition des étapes (a) et (b) ci-dessus mentionnées par l'utilisation d'un chitosane brut une fois ou plus pour fournir ledit chitosane de grade biomédical.

Selon une caractéristique du procédé de préparation du chitosane selon l'invention, le mélange aqueux ci-dessus cité comprend de 5 à 30 % en poids du solvant.

Selon encore une autre caractéristique du procédé de préparation du chitosane selon l'invention le solvant est choisi dans le groupe consistant de l'acétone, éthanol, méthanol, isopropanol, dioxane, tétrahydrofurane et méthyl éthyl cétone.

25 Selon une dernière caractéristique du procédé de préparation du chitosane selon l'invention l'étape (a) est menée en présence d'un gaz inert.

Spécifiquement, le procédé pour préparer une chitine de grade biomédical selon la présente invention comprend les trois étapes suivantes d'opération.

30

Prétraitement

Des coquilles de crustacés peuvent être de préférence prétraitées de diverses manières. Avant tout, les coquilles peuvent être traitées normalement avec de l'eau chaude, par exemple, trempées dans de l'eau chaude à une température comprise entre 40 et 50°C pendant une période de 30 minutes à 1 heure de façon à éliminer les débris et impuretés provenant des coquilles.

Subséquemment, les coquilles sont lavées avec de l'eau, séchées au moyen d'un déshydratant et trempées dans un solvant organique à température ambiante pendant une période de 30 minutes à 1 heure. Les exemples de solvants organiques qui peuvent être utilisés incluent : l'éthanol, méthanol, 5 acétone, tétrahydrofurane (THF), dioxane et méthyl éthyl cétone (MEK). Les coquilles sont ensuite séchées à l'air dans le noir jusqu'à une teneur en eau de 8-12 %. Si les coquilles séchées ne sont pas employées immédiatement, il est important de maintenir les coquilles à un état sec et refroidi avant une utilisation ultérieure. Si le maintien des coquilles n'est pas bon, cela peut dégrader la 10 chitine obtenue à partir de celle-ci en la chitine de poids moléculaire inférieur de celle-ci.

Les coquilles séchées sont ensuite de préférence broyées en des particules poudreuses fines ayant une taille de particule moyenne de 0,5 à 3 mm (de 200 à 300 mesh) en utilisant un broyeur conventionnel.

15

Déminéralisation

Les coquilles broyées (ayant des teneurs en eau de 8-12 %) sont ensuite soumises à un traitement avec HCl de façon à éliminer tout composant minéral, incluant le CaCO₃, pour fournir par là une chitine libre de minéraux.

20

Le traitement avec HCl peut être conduit en deux étapes par la digestion initiale de la poudre de coquilles, prétraitée comme antérieurement décrit, dans une solution aqueuse de HCl à une température comprise entre -10 et 10°C, de préférence -5 à 5°C pendant une période comprise entre 10 et 25 heures, de préférence 15 et 20 heures, tout en agitant au moyen d'un agitateur mécanique ; 25 et, après cela, une digestion supplémentaire dans ladite solution de HCl à une température comprise entre 10 et 20°C, de préférence 12 et 18°C, pendant une période comprise entre 2 et 8 heures, de préférence 3 et 5 heures. Il doit être noté que la température dans la digestion supplémentaire est augmentée rapidement à partir de la température initiale. La solution aqueuse de HCl peut

30

être employée à une concentration comprise entre 0,3 et 4M. L'agitateur mécanique peut être employé à une vitesse d'agitation comprise entre 50 et 200 tours par minute, de préférence à 100 tours par minute ; et, si la vitesse est supérieure à 200 tours par minute, l'efficacité du traitement avec HCl devient inférieure. Pendant le traitement avec HCl, la solution de HCl utilisée est de préférence remplacée par une solution de HCl fraîche une fois ou deux.

35

Alternativement, le traitement avec HCl peut être mené en une étape par digestion de la poudre de coquilles séchée dans une solution aqueuse de HCl à

une température comprise entre -10 et 8°C, de préférence -5 et 5°C, pendant une période comprise entre 20 et 60 heures, de préférence entre 30 et 50 heures tout en agitant.

Le matériau obtenu par filtration après le traitement avec HCl est lavé 5 avec de l'eau pour éliminer tous les composants acides restants, ou ajusté à un pH de 7-9 par l'addition d'une solution de NaOH, et ensuite trempé dans de l'eau déionisée pour une période donnée, par exemple, de 1 heure à 6 heures.

Le matériau obtenu après filtration est ensuite rincé une fois ou deux fois avec un solvant organique séché pour fournir une chitine brute. Les 10 exemples de solvants organiques qui peuvent être utilisés incluent : l'éthanol, méthanol, acétone, THF, dioxane, MEK et les analogues. Le procédé de rinçage avec le solvant apporte de plus une amélioration dans la blancheur de la chitine obtenue et, donc aucune utilisation additionnelle d'un agent réducteur ou oxydant en tant que décolorant n'est requise dans la présente invention.

15

Déprotéinisation

La chitine brute ainsi obtenue est ensuite soumise à des procédures de déprotéinisation et de lavage, pour fournir par là une chitine de grade biomédical, comme suit.

20 Le procédé de déprotéinisation peut être mené par trempage et chauffage de la chitine brute dans une solution aqueuse de NaOH tout en introduisant en continu un gaz inerte. La solution aqueuse de NaOH est employée de façon appropriée à une concentration comprise entre 2 et 10 % en poids. Le traitement avec NaOH est généralement mené à une température comprise entre 80 et 25 100°C pendant une période comprise entre 2 et 4 heures. Des exemples du gaz inerte utilisable incluent : les gaz azote, argon, hélium et néon ; et l'introduction du gaz inerte résulte en une prévention de la rupture de la chaîne de la chitine.

Subséquemment, le matériau obtenu par filtration après le traitement avec NaOH est lavé avec de l'eau pour éliminer tout composé NaOH restant, ou 30 ajusté à un pH de 7-8 par l'addition d'une solution de HCl et ensuite trempé dans de l'eau déionisée pour une période donnée, par exemple, de 1 à 5 heures. Le matériau obtenu après filtration est ensuite rincé une fois ou deux avec ledit solvant organique décrit ci-dessus et séché pour donner une chitine de grade biomédical qui a un degré de pureté, un poids moléculaire et une blancheur élevés.

35 Si désiré, le traitement avec NaOH et les procédures de rinçage ci-dessus mentionnés peuvent être répétés deux fois ou plus ; et, de plus, la chitine

obtenue peut être trempée dans de l'eau déionisée pendant 2 à 5 jours et être ensuite filtrée et séchée sous vide pour augmenter encore plus la blancheur de celle-ci.

5 Selon un autre aspect de la présente invention, un chitosane avec un poids moléculaire et un degré de déacétylation plus élevé peut être obtenu à partir de la chitine préparée par le procédé de la présente invention, comme suit.

10 Premièrement, la chitine préparée comme décrit ci-dessus est traitée avec une solution de NaOH pour fournir un chitosane brut. Le traitement avec NaOH peut être mené par ajout d'une solution aqueuse de NaOH à 30 à 50 % en poids par rapport à la chitine et le chauffage du mélange à une température comprise entre 80 et 100°C pendant une période comprise entre 2 et 12 heures tout en introduisant un gaz inert en continu. Le gaz inert utilisé peut être de ceux décrits ci-dessus.

15 Subséquemment, le chitosane brut est lavé et trempé dans de l'eau déionisée, et ensuite dans un mélange aqueux d'un solvant organique miscible à l'eau, filtré, et séché pour fournir un chitosane relativement pur. Le procédé de trempage sert à améliorer la blancheur du chitosane. Des exemples de solvants organiques qui peuvent être utilisés dans le procédé de trempage incluent : l'acétone, éthanol, méthanol, isopropanol, dioxane, THF, MEK et les 20 analogues ; et, le mélange peut comprendre de 5 à 30 % en poids du solvant.

25 Finalement, le traitement avec NaOH ci-dessus mentionné et les procédures de purification ci-dessus mentionnées sont répétés par utilisation du chitosane une fois pour fournir un chitosane de grade biomédical avec un degré élevé de déacétylation.

Si désiré, de façon à obtenir un tel chitosane pur, le traitement avec NaOH ci-dessus mentionné et les procédés de purification ci-dessus mentionnés peuvent être de plus répétés.

Les exemples suivants ont pour but d'illustrer la présente invention plus spécifiquement, sans limiter l'étendue de l'invention.

30 Dans les exemples, la teneur en CaCO₃ restant dans la chitine a été déterminée en mesurant les résidus de calcination après la combustion de celle-ci dans un four à 800°C pendant 1 heure. La teneur en protéïne a été déterminée en utilisant un kit de test de protéïne, un produit de Bio-Rad, U.S.A., et un spectrophotomètre UV/VIS, un produit de Hewlett-Packard, U.S.A., selon la méthode de Bradford. De plus, la teneur en minéraux a été déterminée par l'utilisation d'un ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrophotometer), un produit de Seiko, Japon, et un spectrophotomètre

AA(Absorption Atomique), un produit de Perkin Elmer, U.S.A. Le degré de déacétylation a été évalué selon le procédé Mima décrit dans J. Appl. Polym. Sci. **28**, 1909 (1983) en utilisant un spectrophotomètre IR (Infrarouge).

- La propriété de blancheur a été évaluée en maintenant la chitine obtenue
 5 finalement dans une atmosphère pendant 30 jours ou plus et ensuite en mesurant l'apparence selon le grade de faible (coloration jaunâtre) ou bon (couleur blanche). En addition, la viscosité a été déterminée en utilisant une solution à 0,5 % de chitosane dans une solution d'acide acétique aqueuse à 1 % et en utilisant un viscomètre Brookfield (axe n°4, à 60 tours par minute).

10

Exemple 1

- 300 g de coquilles de déchets de crabe (Chionoecetes opilio) ont été maintenues dans un bain d'eau de 40 à 50°C pendant 30 minutes et lavées avec
 15 de l'eau jusqu'à ce que la chair du crabe ait été complètement éliminée. Les coquilles ont été déshydratées en utilisant un déshydrateur, trempées dans un bain d'éthanol pendant 1 heure, déshydratées à nouveau et séchées dans le noir pendant 10 jours pour donner 200 g de coquilles de crabe sèches (teneur en eau 10 %).

- 20 Lesdits 200 g de coquilles séchées ont ensuite été broyées en utilisant un broyeur (Mot. WRB 90LB/4P (un produit de Dietz-Motoren GmbH & Co. KG, Germany) dans un intervalle de 0,5 à 3 mm. La poudre de coquilles broyées a ensuite été introduite dans un réacteur équipé d'un agitateur mécanique ; et à celle-ci 5l d'une solution aqueuse de HCl 1N à 0°C a été ajoutée. Le mélange a été maintenu à 0°C pendant 20 heures tout en agitant à la vitesse de 50 tours par minute, réchauffé rapidement à 15°C et maintenu à ce niveau pendant 4 heures.

- 25 Le matériau ainsi traité a été filtré et trempé dans de l'eau. Le pH de la solution contenant le matériau a été ajusté à 7-8 par l'addition d'une solution de NaOH à 5 % en poids et la solution a été maintenue pendant 6 heures. La chitine brute obtenue après filtration a été lavée deux fois avec 3l d'acétone et séchée dans une étuve à vide à 30°C pendant 36 heures.

- 30 Subséquemment, la chitine brute séchée a été trempée dans 6l d'une solution aqueuse de NaOH à 5 % (en poids) et chauffée à 90°C pendant 3 heures tout en introduisant de l'azote gazeux en continu. Après le traitement avec la solution de NaOH, le pH de la solution contenant la chitine brute a été ajusté à 7-8 par l'addition d'une solution de HCl 2N et la chitine brute a été filtrée,

trempée dans 6l d'eau déionisée pendant 6 heures, filtrée, lavée deux fois avec 3l d'acétone, filtrée et séchée dans une étuve à vide à 30°C pendant 12 heures.

La chitine obtenue par les procédures ci-dessus mentionnées a été soumise au procédé de traitement avec NaOH. La chitine a été filtrée, lavée avec 5 de l'eau déionisée cinq à dix fois, trempée dans 6l d'eau déionisée pendant 3 jours, filtrée et séchée sous vide pour obtenir 50 g de chitine de grade biomédical.

Exemple 2

10

Les procédures décrites dans l'exemple 1 ont été répétées sauf que le procédé de traitement avec HCl a été mené en une étape à 0°C pendant 48 heures.

15

Exemple 3

Les procédures décrites dans l'exemple 1 ont été répétées sauf que le procédé de traitement avec HCl a été mené en une étape à 5°C pendant 24 heures.

20

Exemple 4

Les procédures décrites dans l'exemple 1 ont été répétées sauf que le procédé de traitement avec HCl a été conduit en une étape à -8°C pendant 40 heures.

25

Exemples 5 et 6

30

Ces exemples ont pour but de montrer l'effet des conditions (par exemple température et temps) dans le traitement avec HCl sur le niveau de blancheur de la chitine produite. Les procédures décrites dans l'exemple 2 ont été répétées sauf que le procédé de traitement avec HCl a été mené à 15°C pendant 8 heures et à 10°C pendant 24 heures, respectivement.

35

Exemple comparatif 1

200 g de coquilles de crabe séchées ont été broyés à une taille de particule comprise entre 0,5 et 3 mm. La poudre de coquilles broyées a été introduite dans un réacteur équipé d'un agitateur mécanique ; et à celle-ci 51 de solution de HCl 2N ont été ajoutés. Le mélange a été agité pendant 5 heures, refroidi à 0°C et agité à nouveau à cette température pendant 48 heures. Le matériau obtenu ainsi a été filtré, lavé avec de l'eau, trempé dans un solution aqueuse de NaOH 1N à 100°C pendant 12 heures, lavé avec de l'eau et séché pour fournir 80 g de chitine.

Les conditions expérimentales employées dans les exemples 1 à 6 et dans l'exemple comparatif 1 ci-dessus et les propriétés de la chitine produite sont résumées au Tableau 1.

Tableau 1

Conditions de traitement et propriétés		Exemple						Exemple Comparatif
		1	2	3	4	5	6	1
Traitement HCl	Conc.	1N	1N	1N	1N	1N	1N	2N
	Temp. (°C) primaire	0	0	5	-8	15	10	T° amb.
	Temps (h) primaire	20	48	24	40	8	24	5
	Temp. (°C) secondaire	15						0
	temps (h) secondaire	4						48
Traitement NaOH	Conc.	5 % poids						1N
	Temp. (°C)	90						100
	Temps (h)	3						12
Propriété	Blancheur	Bon	Bon	Bon	Bon	Faible	Faible	Faible
	P u r e t é	CaCO ₃ (%)	$\leq 0,1$					
			$\leq 0,1$					
		Métal (ppm)	≤ 60 ppm					
			≤ 113 ppm*					

- * Dans l'exemple comparatif 1, les composés métalliques lourds autres que K, Ca, Mg, Fe, Ba, Zn (détectés dans la chitine préparée par la présente méthode) ont aussi été détectés.

5 Comme montré au Tableau 1, la chitine préparée selon la présente invention a une pureté élevée, un poids moléculaire élevé et une bonne propriété de blancheur.

Exemple 7

10 A une fiole jaugée de 4l ont été ajoutés 45 g de ladite chitine obtenue dans l'exemple 1 et 3l de solution aqueuse de NaOH à 40 % en poids et le mélange résultant a été chauffé à 90°C pendant 7 heures tout en introduisant de l'azote gazeux en continu. Le chitosane brut ainsi obtenu a été lavé avec de l'eau déionisée jusqu'à ce que le pH des eaux de lavages devienne neutre, a été filtré, 15 trempé dans 3l d'eau déionisée pendant 2 jours, filtré et ensuite immédiatement trempé dans 3l d'une solution aqueuse à 10 % d'éthanol pendant 3 jours. Le chitosane brut a été collecté et séché dans une étuve à vide à 40°C pendant 2 jours (traitement avec NaOH primaire).

20 Au chitosane séché ont été ajoutés 3l d'une solution aqueuse de NaOH à 40 % en poids ; et le mélange résultant a été chauffé à 90°C pendant 3 heures tout en introduisant de l'azote gazeux en continu. Le chitosane ainsi obtenu a été soumis aux procédures de lavage décrites dans le traitement primaire avec NaOH pour obtenir un chitosane avec le degré de déacétylation de 90 % ou plus (traitement secondaire avec NaOH).

25 Le chitosane a ensuite été soumis aux traitements primaire et secondaire à nouveau pour obtenir un chitosane avec le degré de déacétylation de 92 % ou plus.

Exemples 8 à 12

30 Ces exemples montrent l'effet du changement dans les conditions de réaction sur les propriétés du chitosane produit. Les procédures telles que décrites dans l'exemple 7 ci-dessus ont été répétées sauf que les conditions de réaction dans le traitement avec NaOH ont été modifiées comme montré au 35 Tableau 2.

Exemple comparatif 2

A une fiole ont été ajoutés 40 g de la chitine obtenue dans l'exemple comparatif 1 ci-dessus et 2,4l d'une solution aqueuse de NaOH à 40 % en poids. Le mélange a été chauffé à 115 C pendant 6 heures, lavé, filtré et séché dans une étuve à vide pour donner le chitosane.

5 Les conditions expérimentales employées dans les exemples 7 à 12 et dans l'exemple comparatif 2 ci-dessus et les propriétés du chitosane produit sont présentées au Tableau 2.

Tableau 2

Conditions de traitement et propriétés		Exemple						Exemple Comparatif
		7	8	9	10	11	12	2
Traitement NaOH	Temp. primaire (°C)	90	120	reflux	90	120	reflux	115°C
	Temps primaire (h)	7	3	3	7	3	3	6
	Temp. secondaire (°C)	90	120	reflux				
	Temps secondaire (h)	3	3	3				
	Blancheur	Bon	Bon	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible
	Degré Déacétylation	≥92%	≥92%	≥92%	≥85%	≥85 %	≥85 %	≥ 82 %
Propriété	P	CaCO ₃ (%)	≤ 0,1					0,8
	u	Protéine (%)	≤ 0,1					≤ 0,3
	t	Métal (ppm)	≤ 60 ppm					≤ 113 ppm*
	e	Viscosité (cps)	≤ 2500					

- * Dans l'exemple comparatif 2, des composants métalliques lourds autres que K, Ca, Mg, Fe, Ba, Zn (détectés dans la chitine préparée par la présente méthode) ont également été détectés.

Comme montré dans le Tableau 2, la présente invention fournit un

- 5 chitosane qui a un degré plus élevé de déacétylation, une pureté et un poids moléculaire plus élevés au moyen de la répétition du traitement avec NaOH et des procédures de lavages deux fois ou plus. De plus, comme dans l'exemple comparatif 2 ci-dessus, le traitement à la chaleur à une température élevée résulte en la rupture de la chaîne et une couleur faible du chitosane. Le chitosane obtenu selon la présente invention est particulièrement utile pour diverses applications dans le domaine médical, qui requièrent un chitosane de haute pureté.

- 10
- 15 Tandis que l'invention a été décrite en relation avec les modes de réalisation spécifiques ci-dessus, il doit être reconnu que des modifications et changements divers qui peuvent être apparents à ceux spécialisés dans l'art auquel l'invention se rapporte peuvent être effectués et tombent également dans le domaine de l'invention comme définie dans les revendications qui suivent.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour préparer une chitine de haute pureté, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

(A) séchage de coquilles de crustacés et broyage des coquilles séchées pour fournir une poudre finement broyée ;

5 (B) digestion initialement de la poudre dans une solution de HCl de 0,4 à 3M à une température comprise entre -10 et 10°C pendant une période comprise entre 10 et 25 heures et, après cela, digestion supplémentaire de la poudre dans la solution de HCl à une température comprise entre 10 et 20°C pendant une période comprise entre 2 et 8 heures ;

10 (C) lavage avec de l'eau, filtration, rinçage avec un solvant organique et séchage du matériau traité avec HCl pour fournir une chitine brute ;

(D) trempage et chauffage de la chitine brute dans une solution de NaOH de 2 à 10 % en poids ; et

15 (E) lavage avec de l'eau, filtration, rinçage avec le solvant organique et séchage de la chitine traitée avec NaOH pour obtenir ladite chitine de haute pureté.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite digestion initiale dans l'étape (B) est menée à une température comprise entre -5 et 5°C pendant une période comprise entre 15 et 20 heures et la digestion supplémentaire de celle-ci est menée à une température comprise entre 2 et 18°C pendant une période comprise entre 3 et 5 heures.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le séchage des coquilles dans l'étape (A) est mené dans le noir jusqu'à ce que la teneur en eau des coquilles soit inférieure ou égale à 12 %.

25 4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la digestion de l'étape (B) est menée avec une agitation au moyen d'un agitateur mécanique à une vitesse comprise entre 50 et 200 tours par minute.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la digestion de l'étape (B) est menée en une seule étape à une température comprise entre -10 et 30 8°C pendant une période comprise entre 20 et 60 heures.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite digestion en une étape est mise en oeuvre à une température comprise entre -5 et 5°C pendant une durée comprise entre 30 et 50 heures.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le solvant employé dans les étapes (C) et (E) est choisi dans le groupe consistant de l'éthanol, méthanol, acétone, tétrahydrofurane, dioxane et méthyl éthyl cétone.

5 8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le trempage avec la solution de NaOH dans l'étape (D) est menée en présence d'un gaz inerte.

9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les étapes (D) et (E) sont répétées deux fois ou plus.

10 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la chitine de haute pureté produite est trempée dans de l'eau déionisée pendant 3 à 4 jours, filtrée et séchée.

11. Procédé pour préparer un chitosane de grade biomédical à partir de la chitine préparée selon le procédé de la revendication 1 ou 5, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

15 (a) trempage de la chitine dans une solution de NaOH à une température comprise entre 80 et 100°C pendant une période comprise entre 2 et 12 heures pour donner un chitosane brut ;

(b) filtration, lavage avec de l'eau, trempage dans de l'eau déionisée et ensuite dans un mélange aqueux d'un solvant organique miscible à l'eau, 20 filtration et séchage du chitosane brut ; et

(c) répétition des étapes (a) et (b) en utilisant le chitosane brut une fois ou plus pour fournir ledit chitosane de grade biomédical.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le mélange aqueux comprend 5 à 30 % en poids de solvant.

25 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le solvant est choisi dans le groupe consistant de l'acétone, éthanol, méthanol, isopropanol, dioxane, tétrahydrofurane et méthyl éthyl cétone.

14. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'étape (a) est menée en présence d'un gaz inerte.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 489120
FR 9310401

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Inventaires concernés de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	FASERFORSCHUNG UND TEXTILTECHNIK vol. 11, no. 7 , 1960 pages 320 - 326 B. CHI MING 'Chitinfasern und chitosandruck' * page 320, colonne de droite, ligne 20 - page 321, colonne de gauche, ligne 45 *	1,5,11
A	JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE vol. 28, no. 6 , 1983 , NEW YORK US pages 1909 - 1917 S. MIMA ET AL. 'Highly deacetylated chitosan and its properties' * page 1910, ligne 1 - ligne 26 * * page 1911, ligne 27 - ligne 42 *	1,11,14
A	WO-A-90 04608 (RTZ CHEMICALS LIMITED) 3 Mai 1990 * exemples 4,5 *	11,14
A	FR-A-2 650 282 (SADUC) 1991 * page 4, ligne 32 - page 5, ligne 25; exemple 1 *	11

DOMAINES TECHNIQUES
RECHERCHES (ex-CL9)

C08B

2

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
3 Novembre 1993	MAZET, J
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un motif une revendication ou matière-plan technologique général O : divulgarion non écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant